

炭酸水素ナトリウムに対する網膜色素上皮の 電氣的反応とその臨床応用

I. ネコおよびウサギにおける分析

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 米村大蔵教授)

瀬 川 安 則

(昭和62年11月9日受付)

眼球常存電位に対して NaHCO_3 静注がおよぼす影響を観察し、さらにその発生機序について検討した。in vivo ではネコとウサギの眼球常存電位は 1.4% NaHCO_3 水溶液静注によって減少した。in vitro ではネコの網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE)・脈絡膜標本をはさんで導出される trans-epithelial potential (TEP) は脈絡膜側浸漬液の HCO_3^- 濃度 ($[\text{HCO}_3^-]$) 上昇によって減少し、視細胞側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇によって増大した。さらに眼球前部標本 (角膜、虹彩、毛様体および水晶体からなる) の角膜側と硝子体側の間の電位差 (in vitro) は硝子体側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ を上昇させても変化せず、また遊離網膜の硝子体側と視細胞側の間の電位差 (in vitro) は硝子体側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇および視細胞側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇いずれによっても減少しなかった。脈絡膜側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇による TEP 減少は 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位の減少と極性において一致していた。従って 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位の減少は主として RPE の脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇の結果であると考えられた。以後 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位の減少を 1.4% NaHCO_3 応答と称する。脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇による TEP 減少が RPE 細胞膜の性質の変化によるものかあるいは paracellular shunt の変化によるものかを明らかにするためにネコ RPE 細胞内記録を行なった。脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇によって RPE 細胞の apical 膜は basal 膜より大きく脱分極し、TEP は減少した。この所見は脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇による TEP 減少が主として RPE 細胞膜の膜電位の変化に起因するものであり paracellular shunt の変化によるものではないことを示唆する。以上の成績から、1.4% NaHCO_3 応答は主として RPE の脈絡膜側における $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇によって誘起される RPE の apical 膜の脱分極に由来する TEP の減少を反映すると考えられる。

Key words retinal pigment epithelium, bicarbonate, electro-oculogram (EOG), electroretinogram (ERG), membrane potential

眼球の前極 (角膜) と後極との間で記録される電位差は一般に眼球常存電位と呼ばれている¹⁾。眼球常存電位は角膜²⁾、水晶体³⁾、毛様体⁴⁾などにも一部由来するが、その大部分は網膜の前後に生じる電位差 (網膜静止電位) に依存し、その主な発生母体は網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) であるとされて

いる⁵⁾。Miller ら⁶⁾はウシガエル RPE・脈絡膜 in vitro 標本にて RPE 細胞内記録を行ない、RPE・脈絡膜標本をはさんで導出される視細胞側陽性の電位 (trans-epithelial potential, TEP⁷⁾) が RPE 細胞の apical 膜の膜電位と basal 膜の膜電位との差に対応することを明らかにした。

Abbreviations: EOG, electro-oculogram; ERG, electroretinogram; $[\text{HCO}_3^-]$, HCO_3^- 濃度; L/D 比, light peak/dark trough 比; NRR, non-retinal response; P_{aCO_2} , 動脈血 CO_2 分圧; RPE, retinal pigment epithelium; TEP, trans-epithelial potential; V_{a} , V_{anterior} ; V_{ap} , apical 膜電位; V_{ba} , basal 膜電位; V_{p} , $V_{\text{posterior}}$; V_{R} , V_{retina} ; V_{w} , V_{whole} .

RPE に関係すると考えられている光誘発応答として non-retinal response (NRR), c 波, 明上昇などが知られている。NRR は Brown⁹⁾ により見出されたが, NRR を RPE 機能検査に応用した報告は見当たらない。c 波は RPE の apical 膜の過分極によると考えられる⁹⁾が, Griff ら¹⁰⁾の実験によると, RPE の apical 膜の Na⁺-K⁺ ポンプの活動低下による脱分極も c 波の形成に関与し, さらに Müller 細胞由来とされる slow P III も c 波の波形や振幅に影響する¹¹⁾。Griff ら¹²⁾ および Linsenmeier ら¹³⁾は明上昇が RPE 細胞の basal 膜の脱分極によって生じることを実証した。Arden ら¹⁴⁾¹⁵⁾はヒトの眼球電位図 (electro-oculogram, EOG) を指標として明上昇を詳細に観察し, light peak/dark trough 比 (L/D 比, Arden ratio) を RPE 活動の指標としてその臨床応用を示した。しかし c 波および明上昇は視細胞に対する光照射を前提とした光誘発応答である。さらに正常な明上昇の発現には RPE, 視細胞のみならず, 内層の網膜も正常であることが必要である¹⁶⁾¹⁷⁾。ゆえに c 波, 明上昇ないしは L/D 比の異常のみから RPE の障害を直ちに断定することはできない。

光刺激を必要としない RPE 層の臨床検査法として 2 つの薬物誘発応答すなわち高浸透圧応答^{18)~25)}と Diamox 応答^{18)25)~27)}がある。眼球常存電位は高浸透圧溶液の静脈内注入によって減少する (ヒト, サル, イヌ, ネコおよびウサギ) ことを当教室で見出し, これを高浸透圧応答と名付けた^{18)~22)28)29)}。高浸透圧応答の発生源は RPE 層に存在し^{29)~32)}, 主に RPE 細胞の basal 膜の過分極に由来する^{25)32)~34)}。さらに米村ら²⁶⁾は眼球常存電位は sodium acetazolamide (Diamox ®) の静脈内注入によって減少する (ヒト, サル) ことを見出し, これを Diamox 応答と名付けた^{18)25)~27)}。Diamox 応答も RPE 層に起源を有するが, 高浸透圧応答とは異なり acetazolamide の RPE 細胞の apical 側への作用によって誘起される basal 膜の過分極に主に由来する²⁵⁾³⁵⁾。これら 2 つの薬物誘発応答は光刺激を必要とせず, 従来の L/D 比とは異質の RPE 層機能検査法として臨床応用され^{24)~27)36)~45)}, 糖尿病性網膜症²⁴⁾²⁵⁾⁴⁰⁾, 黄斑部疾患²⁴⁾²⁵⁾³⁸⁾⁴¹⁾⁴⁵⁾などの種々の網脈絡膜疾患の病態生理の解釈や鑑別診断, 白内障手術後の RPE 機能失調の検出および予後判定⁴³⁾⁴⁴⁾に役立っている。

一方 pH, CO₂ 分圧および HCO₃⁻ 濃度 ([HCO₃⁻]) の変化が網膜電図 (electroretinogram, ERG) の b 波振幅, c 波振幅, light peak 振幅および眼球常存電位に影響することが知られている^{46)~52)}。本編では HCO₃⁻ に着目し, ヒトに投与可能な NaHCO₃ の負荷によっ

て誘発される眼球常存電位の変動を動物眼で観察し, この眼球常存電位の変動が RPE 層に関連し, 高浸透圧応答, Diamox 応答に続く新たな薬物誘発応答として RPE 層機能検査に利用し得ることを述べる。

材料および方法

1. in vivo 動物眼

眼球の前極 (角膜側) と後極 (強膜側) の間に存在する電位差 (眼球常存電位) を in vivo でネコとシロカイウサギで記録した。体重 3~3.5 kg の成熟ネコ 6 匹および成熟シロカイウサギ 3 羽を対象とした。塩酸ケタミン (ケタラール®, 三共) の筋肉内注射麻酔下 (ネコ, 5 mg/kg; シロカイウサギ, 7 mg/kg) で気管内挿管を行ない, 塩化ツボクラリン (アメリゾール®, 吉富製薬) の筋肉内注射によって不動化後に人工呼吸 (1 回換気量, 呼吸数; ネコで 25 ml, 毎分 20 回およびシロカイウサギで 30 ml, 毎分 40 回) を行なった。大腿部皮膚切開後, 大腿静脈に静脈留置針を刺入固定し, 静脈へ入る直前に置いた三方活栓を介して静脈路をとった。角膜表面と眼球後極部強膜上に銀・塩化銀血状電極を置き眼球を前後にはさんだ眼球常存電位 (V_{whole} , 以下では V_w と略記する) を記録し, さらに先端部以外をガラスで被覆した銀・塩化銀線状電極を硝子体中に刺入し, 硝子体中の電極と眼球後極部強膜上の電極との間の電位差 ($V_{\text{posterior}}$, 以下では V_p と略記する) を同時に記録した (図 1)。各電位は直流増幅器 (MEZ-7101, AD-621G; 日本光電) で増幅され, データレコーダー (NFR-3000, DC~200 Hz; ソニー) で記録され, ペンレコーダー (SP-G6P, 理研電

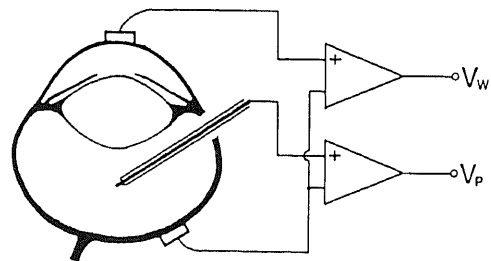


Fig. 1. Schematic diagram of the system used for recording the voltage in the intact eye between the cornea and the posterior surface of the eye (V_w) and between the vitreous and the posterior surface of the eye (V_p). V_w was recorded between a chlorided silver (Ag-AgCl) electrode placed on the cornea and a reference electrode (Ag-AgCl plate) placed retrobulbarly. V_p was recorded between a chlorided silver wire placed in the vitreous and a retrobulbar reference electrode.

子)で観察された。電極の設置に際しては眼球の循環に与える影響を僅少とするために、結膜、外眼筋の切除は必要最小限とした。以上の操作は全て微弱赤色光下で行なった。

負荷薬物には1.4% NaHCO_3 水溶液(浸透圧実測値 $0.30 \times 10^3 \text{ mOsm/kg}$)を用いた。静脈内注入量は5.0~15.0 mlであり、5~8分間をもって定量輸液ポンプ(STC-503, テルモ)を用いて一定速度で注入した。 NaHCO_3 水溶液負荷実験を行なわないときには乳酸加リンゲル液(テクテック®, 太塚製薬)を3~5 ml/kg/hrの速度で注入した。ネコ1匹において1.4% NaHCO_3 水溶液静注前後に総頸動脈血を採取し、pH, CO_2 分圧(Pco_2)および HCO_3^- 濃度($[\text{HCO}_3^-]$)を電極法による血液ガス分析装置(ABL-330, Radiometer社)を用いて測定した。

II. in vitro 網膜色素上皮・脈絡膜標本

網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)・脈絡膜標本から成る in vitro 標本をはさんで導出される trans-epithelial potential (TEP) をネコで記録した。体重3~3.5 kgの成熟ネコ6匹6眼を用いた。12時間の暗順応後に塩酸ケタミン5 mg/kgの筋肉内注射麻酔下で眼球を摘出した。摘出した眼球を赤道部で切断し、眼球を前部と後部の眼杯に分け、後部の眼杯から網膜を剝離除去した。輝板に対応する部位または輝板以外に対応する部位から約5 mm四方の切片を得、ついで強膜を切片から剝離除去してRPE・脈絡膜標本とした。各々40 mlの容積をもつ2個のアクリル樹脂容器(図2)の相接する面にあけた小孔(直径3 mm)の間にRPE側を上にしてナイロンメッシュにのせたRPE・脈絡膜標本を装着した。各々の容器内に浸漬液を満たし25 ml/minの速度で灌流した。一対の銀・塩化銀血状電極を塩橋(浸漬液を浸ませた脱脂綿)を介して各容器の浸漬液中に配置した。各容器から導出した電位を直流増幅器(MEZ-8201, RDU-5; 日本光電)で増幅しデューレコーダー(NFR-3000, DC~200 Hz; ソニー)に記録し、ペンレコーダー(SP-G6P, 理研電子)で観察した。本報ではTEPがRPEの脈絡膜側にくらべて視細胞側陽性または陰性となる電位変化を示した際にそれぞれTEPの増大または減少と仮称する。

使用した浸漬液の組成(mM)は、対照浸漬液ではNaCl 110.0, KCl 3.6, CaCl_2 0.5, MgSO_4 0.5, NaHCO_3 15.0, CH_3COONa 23.0, glucose 20.0であり、 $[\text{HCO}_3^-]$ を増大させた浸漬液ではNaCl 110.0, KCl 3.6, CaCl_2 0.5, MgSO_4 0.5, NaHCO_3 35.0, NaH_2PO_4 3.0, glucose 20.0であった。 $[\text{HCO}_3^-]$ を増減させる際には NaHCO_3 を CH_3COONa で置換した。浸漬液pHを容器内の標

本の近傍でpHメーター(HM-30S, TOA社)を用いて測定した。pHの調整は150 mMのNaOHまたは NaH_2PO_4 ないし CH_3COOH を滴下することによって行なわれた。蒸気圧法による浸透圧計(OSM-1, 島津製作所)を用いて浸透圧を測定した。使用した浸漬液の浸透圧は全て305~325 mOsm/kgの範囲内にあった。

III. in vitro 眼球前部標本

眼球前部(角膜、虹彩、毛様体、水晶体および一部の強膜からなる)in vitro 標本の角膜側と硝子体側との間の電位差(V_{anterior} , 以下では V_a と略記する)をネコで記録した。摘出眼球の赤道部で切断して得られた前部(角膜、虹彩、毛様体、水晶体および一部の強膜からなる)2標本を用いた。各々40 mlの容積をもつ2個のアクリル樹脂製容器(IIと同様の構造、図2)の相接する面にあけた円孔(直径15 mm)の間に上記の眼球前部標本を装着し、各々の容器内に浸漬液を満たし25 ml/minの速度で灌流した。電極、記録装置および浸漬液にはTEPの観察に用いたものと同様のものを用いた。

IV. in vitro 遊離網膜標本

ネコの遊離網膜in vitro 標本をはさんで導出される硝子体側と視細胞側の間の電位差(V_{retina} , 以下では V_R と略記する)を記録した。摘出眼球の赤道部で切断して得られた後部眼杯から網膜を剝離した。この遊離網膜の硝子体側を上にしてナイロンメッシュにのせ、IIと同様の容器(図2)に装着し、各々の容器内に浸漬液を満たし25 ml/minの速度で灌流した。電極、記

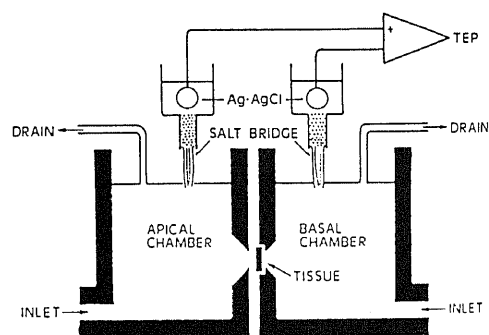


Fig. 2. Diagram of the perfusion chamber used for recording the trans-epithelial potential (TEP). The main chamber was divided into the apical and basal chambers. Each chamber had a volume of 40 ml and had a circular hole of 3 mm in diameter. Each chamber was perfused at a rate of 25 ml/min. Two Ag-AgCl electrodes were placed symmetrically in the salt bridges on each side of the tissue to record TEP.

録装置および浸漬液には TEP の観察に用いたものと同様のものを用いた。本報では V_R が遊離網膜標本の視細胞側にくらべて硝子体側陽性または陰性となる電位変化を示した際にそれぞれ V_R の増大または減少と仮称する。

V. 網膜色素上皮細胞内記録

ネコの RPE・脈絡膜標本を用い、細胞内微小電極法によって RPE 細胞の膜電位を記録した。RPE 細胞膜電位の記録方法は向の報告³³⁾に準じた。前記 II の方法で作成した RPE・脈絡膜標本を直径 3 mm の小孔をもつ 2 枚の亚克力板 (台座, mounting chip) の間にはさみ、この台座を視細胞側を上にして水平面に対して 45° の角度で容器に装着した。容器は台座により各々 3 ml の容積をもつ視細胞側槽 (apical bath) と脈絡膜側槽 (basal bath) に分けられる (図 3)。両槽に浸漬液を満たし 10 ml/min の速度で灌流した。RPE 細胞の膜電位の導出にはガラス微小電極と視細胞側槽および脈絡膜側槽に塩橋を介して接続した一対の銀・塩化銀電極を用いた。ガラス微小電極には 3M-KCl を充填し、斜角研磨を行なった。この条件におけるガラス微小電極の電気抵抗は 20~50 MΩ であった。RPE の視細胞側よりガラス微小電極をパルスモーター駆動油圧マイクロマニピュレーター (MO-81, 成茂製作所) を用いて 1~3 μm づつ進め RPE の単一細胞に刺入した。ガラス微小電極からの導線として銀・塩化銀線 (直径 0.3 mm) を用い、TEP, apical 膜の膜電位 (V_{ap}) および basal 膜の膜電位 (V_{ba}) を同時記録した (図 4)。各電極から導出された電位は微小電極増幅器 (膜電位, MEZ-7101; TEP, MEZ-8201; 日本光電)

を介して直流増幅器 (膜電位, AVH-10; TEP, RDU-5; 日本光電) で増幅され、陰極線オシロスコープ (VC-10, 日本光電) にてモニターされ、データレコーダー (NFR-3000, DC~200 Hz; ソニー) に記録され、ペンレコーダー (SP-G6P, 理研電子) で観察された。

成 績

I. in vivo 動物眼

薬物負荷実験に先立ち、角膜面照度 300 lux の白色光を 6 秒間照射し、明上昇を観察した。その一例を図 5 に示す。 V_p および V_w は光刺激後徐々に増大し、4 分後に light peak に達した。明上昇による V_p の電位変化はどの時点においても明上昇による V_w の電位変化の約 1.25 倍であった (図 5)。

成熟ネコ 5 匹に 5.0~15.0 ml の 1.4% NaHCO₃ 水溶液を 5~8 分で静注し、 V_w および V_p の変化を観察した。1.4% NaHCO₃ 水溶液を静注しない時には乳酸加リンゲル液もしくはリンゲル液 (ソリタ T3®, 武田薬品) を静注した。1.4% NaHCO₃ 水溶液静注による V_w および V_p の変化は振幅において多少の差違は見られたが、極性においては上の 5 匹では同様であった。その一例を図 6 に示す。40 分以上の暗順応により V_w および V_p が暗所定常値に達したことを確認した後、暗順応を継続したままで乳酸加リンゲル液を 0.56 ml/min/kg の速度で静注した。 V_w および V_p が安定した後に乳酸加リンゲル液の静注を中断し、直ちに 1.4% NaHCO₃ 水溶液 (浸透圧 0.30×10^3 mOsm/kg) を上記と同一の速度で 10.0 ml, 6 分間静注した。静注を 1.4% NaHCO₃ 水溶液に切り替えると V_w と V_p

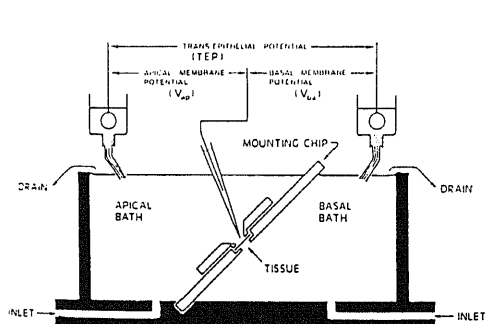


Fig. 3. Diagram of the perfusion chamber used for intracellular recordings. The mounting chip consisted of two plates, each of which had a 3 mm centered circular hole. The two sides of the tissue, apical surface of retinal pigment epithelium (RPE) vs. choroid, hereafter called basal surface, were immersed in 3.0 ml baths separately perfused at a rate of 10 ml/min.

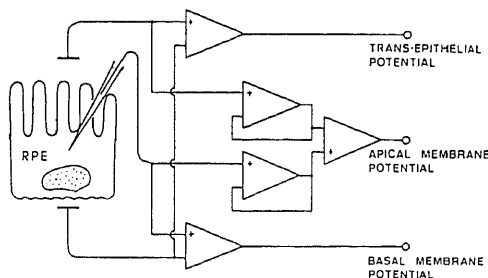


Fig. 4. Schematic diagram of the system used for recording TEP and intracellular potentials from the retinal pigment epithelial cell (RPE cell). Two Ag-AgCl electrodes were symmetrically placed on each side of the tissue. A glass microelectrode filled with 3M-KCl was used to record the intracellular potential of RPE cells. Apical membrane potentials were recorded differentially between the intracellular microelectrode and the apical reference electrode.

は減少し始め6分後に極小値に達した。静注液を乳酸加リンゲル液に戻すと V_w と V_p は極小値から徐々に増大しもとの値に近づいた。1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_p の電位変化はどの時点においても1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w の電位変化の約1.25倍であった(図6)。この値は同一眼の明上昇(図5)で観察された比率と同じであった。総頸動脈から採取した動脈血の血漿 HCO_3^- 濃度 ($[\text{HCO}_3^-]$) は1.4% NaHCO_3 水溶液静注前においては17 mEq/l から静注5分後には22 mEq/l へと上昇したが、血漿 pH は1.4% NaHCO_3 水溶液静注前においては7.42 から静注5分後には7.50 へと0.08 上昇したに過ぎず、また P_{aCO_2} は静注前後でほとんど変化しなかった。

成熟シロカイウサギ3羽に5.0~15.0 ml の1.4% NaHCO_3 水溶液を5~8分で静注し、 V_w および V_p の変化を観察した。1.4% NaHCO_3 水溶液を静注しない時には乳酸加リンゲル液を静注した。1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w および V_p の変化は振幅において多少の差違は見られたが、極性においては上の3匹では同様であった。その一例を図7に示す。40分以上の暗順応により V_w および V_p が暗所定常値に達したことを確認した後に、暗順応を継続したまま乳酸加リンゲル液を0.28 ml/min/kg の速度で静注した。 V_w および V_p が安定した後に乳酸加リンゲル液の静注を中断し、直ちに1.4% NaHCO_3 水溶液を同一速度で5.8 ml, 7分間静注した。静注を1.4%

NaHCO_3 水溶液に切り替えると V_w と V_p は減少し始め8分後に極小値に達した。静注液を乳酸加リンゲル液に戻すと V_w と V_p は極小値から徐々に増大しもとの値に近づいた。1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_p の電位変化はどの時点においても1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w の電位変化の約2.0倍であった(図7)。

II. in vitro 網膜色素上皮・脈絡膜標本

ネコの RPE・脈絡膜標本を用い trans-epithelial potential (TEP) に対する $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇の効果を検討した。標本作成後に対照浸漬液を灌流し始めると TEP は徐々に増大し、灌流開始後10~30分で定常値に達した。いずれの標本でも TEP は RPE の脈絡膜側に対して視細胞側陽性の極性を呈した。輝板に対応する部位から得た3標本における TEP の対照浸漬液灌流中の値は2.5~9.5 mV であった。 $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇による TEP の変化は振幅には多少の差は見られたが、極性と時間経過は上記の3標本では同様であった。同一標本から得られたその一例を図8に示す。 $[\text{HCO}_3^-]$ を15 mM から35 mM に増加させた浸漬液を脈絡膜側に負荷すると TEP は負荷開始後13分で0.8 mV 減少し、負荷中止によって TEP は極小値から増大しほぼ負荷前の値に復した(図8A)。 $[\text{HCO}_3^-]$ を15 mM から35 mM に増加させた浸漬液を視細胞側に負荷すると TEP は負荷開始後8分で1.2 mV 増大し、負荷中止によって TEP は極大値から減少しほぼ負荷前の

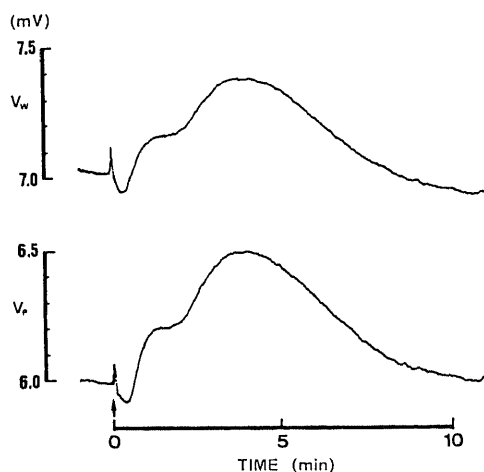


Fig. 5. The V_w and V_p response in cat eye after a 6 sec period of illumination at 300 lux (arrow). V_w (upper record) and V_p (lower record) peaked at 4 min following the c-wave deflection. The amplitude of the V_p peak was approximately 1.25 times greater than that of V_w .

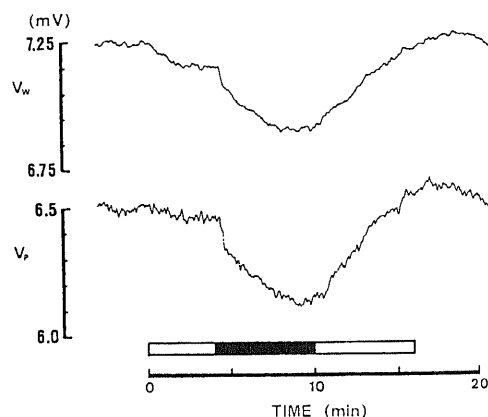


Fig. 6. Responses of V_w and V_p to an intravenous injection of 1.4% NaHCO_3 solution in the cat. Lactate Ringer's solution was injected at a rate of 0.56 ml/min/kg (white horizontal bar) before and after 1.4% NaHCO_3 injection (black horizontal bar) at the same rate. V_w (upper record) and V_p (lower record) decreased after 1.4% NaHCO_3 injection. The amplitude of V_p was approximately 1.25 times larger than that of V_w .

値に復した (図 8B)。輝板のない部分に相当する部位から得た 3 標本における TEP の対照浸漬液灌流中の値は 1.5~10.0 mV であった。[HCO₃⁻] 上昇による TEP の変化は振幅には多少の差は見られたが、極性と時間経過は上記の 3 標本では同様であった。同一標本から得られたその一例を図 9 に示す。輝板に対応する部位から得た標本を用いた場合 (図 8) と同様の変化が観察された。[HCO₃⁻] を 15 mM から 35 mM に増加させた浸漬液を脈絡膜側に負荷すると TEP は負荷開始後 8 分で 0.5 mV 減少し、負荷中止によって TEP は極小値から増大しほぼ負荷前の値に復した (図 9A)。[HCO₃⁻] を 15 mM から 35 mM に増加させた浸漬液を視細胞側に負荷すると TEP は負荷開始後 8 分で 0.5 mV 増大し、負荷中止によって TEP は極大値から減少しほぼ負荷前の値に復した (図 9B)。

ネコの RPE・脈絡膜標本を用い、TEP に対する pH 上昇の影響を検討した。輝板のない部分に相当する部位から得た RPE・脈絡膜標本を対照浸漬液で灌流し TEP が安定した後に、150 mM の NaOH を加え pH を 7.68 とした浸漬液を視細胞側に負荷すると、視細胞側容器の pH は負荷前の 7.42 から負荷開始後 2 分で 7.68 へと上昇したが、TEP には負荷開始前後で変化は見られなかった (図 10A)。負荷を中止し再度対照浸漬液で灌流した後、上記の pH を上昇させた浸漬液を脈絡膜側に負荷すると、脈絡膜側容器の pH は負荷前の 7.42 から負荷開始後 2 分で 7.68 へと上昇した

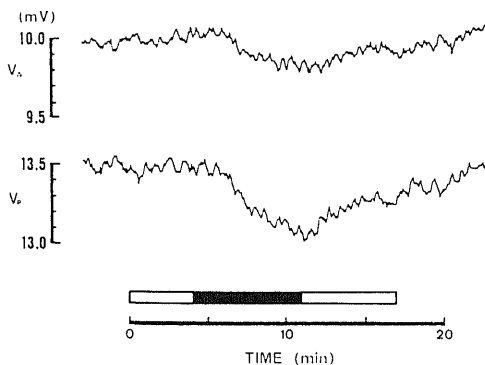


Fig. 7. Responses of V_w and V_p to an intravenous injection of 1.4% NaHCO₃ solution in the albino rabbit. Lactate Ringer's solution was injected at a rate of 0.28 ml/min/kg (white horizontal bar) before and after 1.4% NaHCO₃ injection (black horizontal bar) at the same rate. V_w (upper record) and V_p (lower record) decreased after 1.4% NaHCO₃ injection. The amplitude of V_p was approximately 2.0 times larger than that of V_w .

が、TEP は負荷開始前後で変化しなかった (図 10B)。

III. *in vitro* 眼球前部標本

ネコの眼球前部標本 (角膜、虹彩、毛様体および水晶体からなる) を用い、角膜側と硝子体側の間に生じる電位差 (V_a) に与える硝子体側 [HCO₃⁻] 増加の影響を観察した。浸漬液の組成は RPE・脈絡膜標本の場合に用いた浸漬液と同様とした。対象とした 2 標本には角膜側を陽性とする 1.0 ないし 1.5 mV の電位差 (V_a) が観察された。眼球前部標本を対照浸漬液で灌流し始めると、 V_a は灌流開始後 10 ないし 15 分で定常値に達した。[HCO₃⁻] を 15 mM から 35 mM に増加させた浸漬液を水晶体側に負荷したが、 V_a は不変であった (図 11)。

IV. *in vitro* 遊離網膜標本

ネコの遊離網膜標本を用い、硝子体側あるいは視細胞側 [HCO₃⁻] 増加が遊離網膜の硝子体側と視細胞側の間に生じる電位差 (V_R) に与える影響を観察した。浸漬液の組成は RPE・脈絡膜標本の場合に使用した浸漬液と同様とした。標本作成後に対照浸漬液を灌流した。遊離網膜の硝子体側と視細胞側の間には硝子体側陽性の 0.12 mV の電位差 (V_R) が見られた。[HCO₃⁻] を 15 mM から 35 mM に増加させた浸漬液を硝子体側に負荷すると V_R は負荷開始後 1 分で 0.28 mV 増大

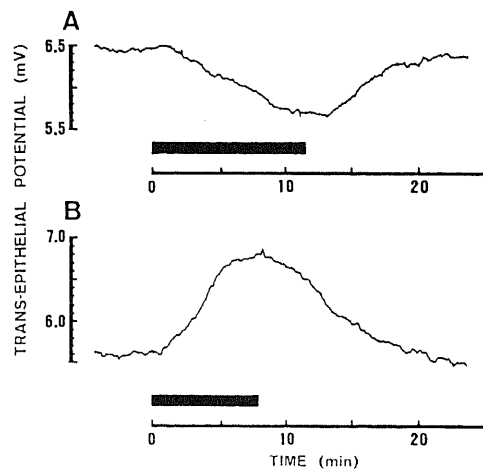


Fig. 8. Changes in the TEP induced by raising HCO₃⁻ concentration ([HCO₃⁻]) in cat RPE-choroid, obtained from the tapetal region of the eye. Responses in A and B were recorded from the same preparation. The apical surface of RPE was positive with respect to the choroidal surface. [HCO₃⁻] was raised by 20 mM (black horizontal bar). An increase of [HCO₃⁻] in the basal side decreased TEP (A), while an increase of [HCO₃⁻] in the apical side increased TEP (B).

し極大となった後に徐々に減少し、負荷前の値にほぼ復した。負荷を中止すると V_R は負荷中止後 1 分で 0.24 mV 減少し極小となった後に徐々に増大し、負荷前の値にほぼ復した (図 12A)。[HCO₃⁻] を 15 mM から 35 mM に増加させた浸漬液を視細胞側に負荷した、 V_R はほとんど変化しなかった (図 12B)。[HCO₃⁻]

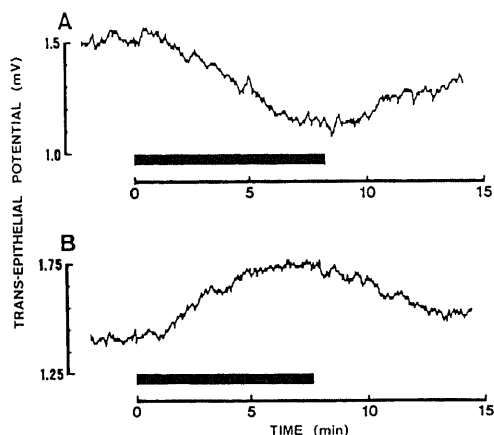


Fig. 9. Changes in the TEP induced by raising the [HCO₃⁻] in cat RPE-choroid, obtained from the non-tapetal region of the eye. Responses in A and B were recorded from the same preparation. The apical surface of RPE was positive with respect to the choroidal surface. [HCO₃⁻] was raised by 20 mM (black horizontal bar). An increase of [HCO₃⁻] in the basal side decreased TEP (A), while an increase of [HCO₃⁻] in the apical side increased TEP (B).

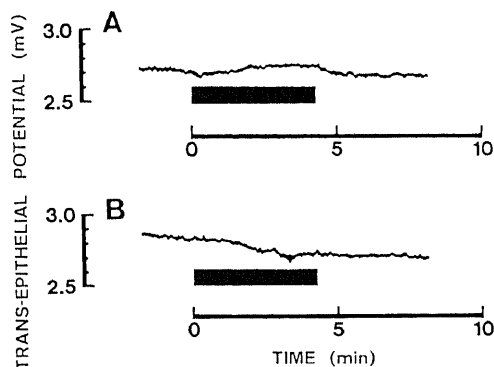


Fig. 10. The response of TEP to a pH increase in cat RPE-choroid, obtained from the non-tapetal region of the eye. Responses in A and B were recorded from the same preparation. The pH of the perfusing solution was increased (black horizontal bar) from 7.42 to 7.68 in the apical side (A) or in the basal side (B).

を硝子体側、視細胞側いずれで増加させても V_R は減少しなかった。この V_R の [HCO₃⁻] 増加に対する消長は in vivo における 1.4% NaHCO₃ 水溶液静注による V_w および V_p の減少とは極性において合致しなかった。

V. 網膜色素上皮細胞内記録

ネコの RPE・脈絡膜標本を用い RPE 細胞の膜電位におよぼす [HCO₃⁻] 上昇の影響を細胞内微小電極法によって検討した。ネコ RPE 細胞の膜電位は、ガラス微小電極が RPE 細胞内に刺入されたときから 10~20 分後に安定し、その後 30~60 分間記録された。対照浸漬液灌流中の V_{ap} の値は -75~-85 mV であった。浸

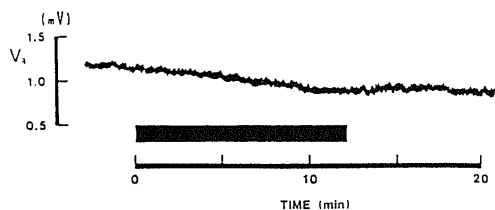


Fig. 11. The potential response from the excised anterior segment of cat eye to an increase of [HCO₃⁻]. The potential was recorded between the corneal side and the vitreous side (V_a) of the anterior segment. [HCO₃⁻] was increased by 20 mM (black horizontal bar) in the vitreous side.

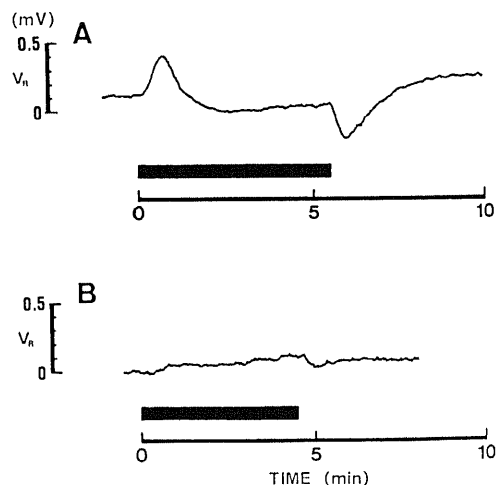


Fig. 12. Changes in the trans-retinal potential (V_R) induced by raising [HCO₃⁻] in isolated cat retina. [HCO₃⁻] was raised by 20 mM (black horizontal bar). Responses in A and B were recorded from the same preparation. An increase of [HCO₃⁻] in the vitreous side increased V_R transiently (A), while an increase of [HCO₃⁻] in the receptor side had almost no effect on V_R (B).

浸漬液の [HCO₃⁻] を 20 mM 上昇させ得た 4 細胞では、膜電位の変化の極性と時間経過はいずれの細胞においても同様であった。その一例を図 13, 14 に示す。脈絡膜側浸漬液 [HCO₃⁻] を 20 mM 上昇させると RPE 細胞の apical 膜および basal 膜はともに脱分極した (図 13)。脱分極の程度は basal 膜 (1.6 mV) に比べて apical 膜 (2.0 mV) で大きかった。TEP は RPE 細胞の膜電位変化に対応して 0.4 mV 減少した。視細胞側浸漬液 [HCO₃⁻] を 20 mM 上昇させると RPE 細胞の apical 膜および basal 膜はともに過分極した (図 14)。過分極の程度は basal 膜 (3.2 mV) に比べて apical 膜 (4.0 mV) で大きかった。TEP は RPE 細胞の膜電位変化に対応して 0.8 mV 増大した。

また矩形波電流 (1.0 μ A, 持続時間 3.0 sec) 通電によって発生する電位変化 (図 13, 14 のスパイク状のふれ) から測定されたネコの RPE・脈絡膜標本の組織電気抵抗は視細胞側、脈絡膜側いずれの [HCO₃⁻] 上昇の場合でもほとんど変化しなかった。

考 察

ネコとシロカイウサギでは、1.4% NaHCO₃ 水溶液

を静脈内注入すると眼球前極と後極との間に存在する眼球常存電位 (V_w) は減少し (図 6, 7), さらに V_w 減少の時間経過に対応して硝子体中の電極と眼球後極に置いた電極との間の電位差 (V_p) が減少することが示された (図 6, 7)。1.4% NaHCO₃ 水溶液静注による V_p の電位変化は観察した範囲の全時間経過にわたり 1.4% NaHCO₃ 水溶液静注による V_w の電位変化の約 1.25 倍であり、この電位変化の比は同一眼で観察された明上昇の経過中における V_w と V_p の電位変化 (図 5) の比 (約 1.25) と一致した (ネコ)。明上昇は網膜に由来し¹²⁾¹³⁾、網膜以外の組織には明上昇を発生する部位がない¹²⁾¹³⁾⁵²⁾。ゆえに、 V_p と V_w の電位変化の違いは extraretinal shunt pathway の組織電気抵抗が角膜上に電極を置いた場合よりも硝子体中に電極を置いた場合においてより大きいためであると Steinberg ら⁵²⁾ は解釈した。この理論に準拠すれば、本編で示した 1.4% NaHCO₃ 水溶液静注による V_w と V_p の電位変化の比が、同一眼で観察された明上昇 (図 5) における比と同じであったという成績によって、1.4% NaHCO₃ 水溶液静注による V_w の減少は主として網膜、脈絡膜、強膜のいずれか、もしくはそれらのいく

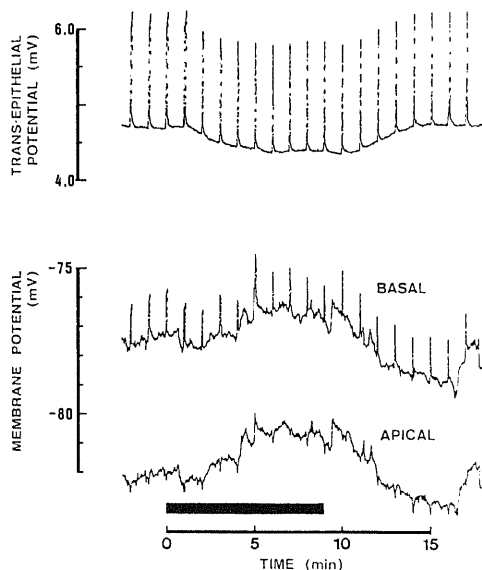


Fig. 13. Changes in the TEP and membrane potentials of the RPE cell induced by raising basal [HCO₃⁻] in cat RPE-choroid. Basal [HCO₃⁻] was raised by 20 mM (black horizontal bar). The basal membrane potential (V_{ba}) was superimposed on apical membrane potential (V_{ap}) by the amplitude of TEP. Spiky deflections were produced by extrinsic trans-epithelial current pulses (1 μ A, 3 sec).

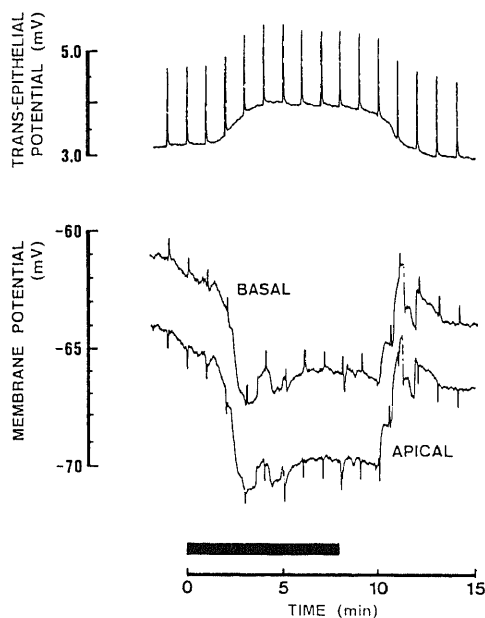


Fig. 14. Changes in the TEP and membrane potentials of the RPE cell induced by raising apical [HCO₃⁻] in the cat RPE-choroid. Apical [HCO₃⁻] was raised by 20 mM (black horizontal bar). V_{ba} was superimposed on V_{ap} by the amplitude of TEP.

つかに起源を有するものであって、角膜、水晶体、虹彩および毛様体由来するとは考え難い。さらに眼球前部（角膜、水晶体、虹彩および毛様体からなる）in vitro 標本において角膜側と硝子体側の間で記録された電位差が硝子体側の HCO_3^- 濃度 ($[\text{HCO}_3^-]$) を増加させても変化しなかった（図 11）ことは、in vivo における 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w 減少には角膜、水晶体、虹彩および毛様体は関与しないとの推測の証左であろう。ゆえに、1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w 減少（図 6, 7）は 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_p の減少を主に反映するといえよう。 V_p （硝子体中の電極と眼球後極に置いた電極との間の電位差）は、Steinberg ら⁵²⁾ のネコにおける研究によれば神経上皮層の硝子体側と視細胞側との間の電位差と網膜色素上皮（retinal pigment epithelium, RPE）層の視細胞側と脈絡膜側との間の電位差（trans-epithelial potential, TEP）の和を主に反映するという。私が観察したネコ遊離網膜の硝子体側と視細胞側との間の電位差は硝子体側、視細胞側いずれで $[\text{HCO}_3^-]$ を増加させても減少しなかった（図 12）から、本編で観察された 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w および V_p の減少（図 6, 7）は RPE 層の視細胞側と脈絡膜側との間の電位差である TEP の減少を主に反映していることになろう。

1.4% NaHCO_3 水溶液静注による V_w および V_p の減少が TEP の減少を主に反映しているという上記の主張は以下に述べる本編のネコの RPE・脈絡膜標本を用いて得られた成績（図 8, 9）によっても支持される。in vivo において 1.4% NaHCO_3 水溶液を静注すると血漿 $[\text{HCO}_3^-]$ および pH が増大したが Pco_2 はほとんど変化しなかったこと（成績 I）、および血中 CO_2 は一部は溶存 CO_2 として、残る大部分は HCO_3^- として存在することを鑑みるに、 $[\text{HCO}_3^-]$ 増大あるいは pH 増大が TEP に影響をおよぼす可能性が考えられる。この点を検討する目的でネコの RPE・脈絡膜 in vitro 標本から導出した TEP におよぼす浸漬液中の $[\text{HCO}_3^-]$ および pH の影響を観察したところ、以下に述べるごとく $[\text{HCO}_3^-]$ 増大は TEP に影響し、pH 上昇は TEP に影響を与えないことが示された。まず $[\text{HCO}_3^-]$ 増加の TEP におよぼす影響を観察したところ、脈絡膜側浸漬液中の $[\text{HCO}_3^-]$ を増加させると TEP は減少し（図 8A, 9A）、この TEP 減少は in vivo における 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位減少と極性（図 6）において合致した。しかし視細胞側浸漬液中の $[\text{HCO}_3^-]$ を増加させると TEP は増大し（図 8B, 9B）、この TEP 増大は 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位減少と極性（図 6）に

おいて相反した。すなわちこの成績は眼球常存電位が 1.4% NaHCO_3 水溶液静注によって減少する現象が RPE 層の脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 増加による TEP 減少を少なくとも反映していることを示唆している。また輝板に対応する部位から得られた標本から導出された TEP（図 8）と輝板に対応しない部位から得られた標本から導出された TEP（図 9）の $[\text{HCO}_3^-]$ 増加による変化は極性において一致し、程度と時間経過において近似していたことは、 $[\text{HCO}_3^-]$ 増加が TEP におよぼす効果には部位の特殊性が存在しないことを意味するのかもしれない。なお TEP におよぼす pH 上昇の影響を観察したが、浸漬液中の pH を脈絡膜側あるいは視細胞側のいずれで 7.42 から 7.68 へと上昇させても TEP は変化しなかった（図 10）。この本編の成績は Steinberg ら⁵³⁾ のカエル RPE・脈絡膜 in vitro 標本において脈絡膜側あるいは視細胞側の浸漬液中の pH を 6.6 から 8.3 へと変化させても TEP が影響を受けなかったという報告と矛盾しない。また Singer ら⁵⁴⁾ によれば、ヒトで 7.5% NaHCO_3 水溶液を 150~200 ml 静注しても血漿 pH は 0.1 程度上昇するにすぎないという。したがって本編の pH に関する成績（図 10）および Steinberg ら⁵³⁾、Singer ら⁵⁴⁾ の報告を参照するに、pH 6.6~8.3 の範囲では TEP は pH 変化の影響を受けないことからすれば、in vivo における 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位減少は血漿 pH 変化のみによって生じたとは考え難い。網膜の活動以外の要素（眼圧など）の影響を受けない in vitro において RPE 層の脈絡膜側の $[\text{HCO}_3^-]$ 増加によって TEP が減少したことから、in vivo で 1.4% NaHCO_3 水溶液を静注すると、眼圧、循環動態など網膜の活動以外の要素の変化によってではなく、RPE 層の主に脈絡膜側の $[\text{HCO}_3^-]$ 増加によって TEP が減少し、この TEP 減少は眼球常存電位減少として観察されると推測される。以下では 1.4% NaHCO_3 水溶液静注によって眼球常存電位が減少する現象を 1.4% NaHCO_3 応答と呼ぶことにする。

上述のごとく 1.4% NaHCO_3 応答は RPE 層の脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 増加に対する TEP 減少を主に反映し、その発生源は RPE 層に存在すると推論される。つづいて RPE 層の脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 増加による TEP 減少の発現機序について考察する。TEP は Miller ら⁶⁾ および Steinberg ら⁵²⁾ によれば RPE 細胞の apical 膜の膜電位 (V_{ap}) と basal 膜の膜電位 (V_{ba}) の差に対応している電位であり、 V_{ap} と V_{ba} の関数とみなすことができるので、以下では RPE 層の脈絡膜側 $[\text{HCO}_3^-]$ 増加による TEP 減少を RPE の膜電位の変化の観点から考察したい。Miller ら⁶⁾ および Steinberg ら⁵²⁾ の

理論によれば TEP を変化させる因子として次の 2 つの可能性が考えられる。すなわち、(1) apical 膜または basal 膜のいずれか一方の、あるいは両者の電氣的性質 (イオンに対する平衡電位、イオンに対する膜コンダクタンスおよび electrogenic pump rate) の変化、または (2) paracellular shunt resistance および paracellular shunt potential (paracellular shunt 機構) の変化である。Miller ら⁹⁾ および Steinberg ら⁵²⁾ の理論によれば上記(1)のように一方の RPE 細胞膜の電氣的性質のみが変化した場合には両側の膜電位はともに同方向に変化し、かつ電氣的性質の変化した方の細胞膜の電位変化は他方の細胞膜の電位変化より大きいという。一方上記(2)のように paracellular shunt 機構のみが変化する場合には膜電位は互いに反対方向に変化するとされる。本編の成績で見られたように apical 膜および basal 膜は脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加ではともに脱分極し、脱分極の程度は basal 膜にくらべて apical 膜においてより大きく (図 13)、また apical 膜および basal 膜は視細胞側 [HCO₃⁻] 増加ではともに過分極し、過分極の程度は basal 膜にくらべて apical 膜においてより大きく (図 14)、脈絡膜側および視細胞側のいずれにおける [HCO₃⁻] 増加でも RPE 細胞の apical および basal の両膜電位変化は互いに反対の極性をとることはなかった。さらに矩形波電流通電によって発生する電圧変化から測定された RPE・脈絡膜標本の組織電気抵抗には脈絡膜側および視細胞側いずれの [HCO₃⁻] 増加の場合でもほとんど変化は認められなかった (図 13, 14)。また Miller ら⁹⁾ によればカエル RPE・脈絡膜標本において paracellular shunt resistance は 2.75~55 mM の範囲の [HCO₃⁻] では変化しなかったという。したがって本編の成績 (図 13, 14) と Steinberg ら⁵²⁾、Miller らの理論⁹⁾ および報告⁹⁾ を勘案すると [HCO₃⁻] 増加によって生じた RPE 細胞の膜電位変化における上記(2)のような paracellular shunt 機構の関与はたとえ存在するとしても優位を占めないと推定され、ゆえに [HCO₃⁻] 増加によって生じた RPE 細胞の膜電位変化は主として上記(1)のような膜の電氣的性質の変化によって誘起されたと考えられる。しかも脈絡膜側、視細胞側いずれの [HCO₃⁻] 増加でも apical 膜が basal 膜に比べより大きな電位変化を示した (図 13, 14) ので、本編で観察された [HCO₃⁻] 増加による膜の電氣的性質の変化は Miller ら⁹⁾ および Steinberg ら⁵²⁾ の理論に準拠すれば主として apical 膜に生じたと推測される。したがって本編の成績を Miller ら⁹⁾ および Steinberg ら⁵²⁾ の理論に基づいて解釈すれば、RPE 層の脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加によって RPE 細胞の apical 膜の電氣的性質が変化して apical

膜が脱分極し TEP は減少したと考えられ、ゆえに 1.4% NaHCO₃ 応答は主に apical 膜の脱分極に起因して生じることが示唆される。

RPE 層の脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加によって RPE 細胞の主に apical 膜が脱分極すると推論した。この現象のように RPE 層の視細胞側あるいは脈絡膜側の一方の浸漬液組成変化により主に反対側の膜の電氣的性質が変化したと考えられる現象は他にもみられる。例えば Kawasaki ら³⁴⁾ はカエル RPE・脈絡膜標本の視細胞側浸漬液中に 1 mM の sodium acetazolamide を加えると basal 膜が apical 膜に比しより大きく過分極することを観察し、この basal 膜の電氣的性質の変化には RPE 細胞内のイオンあるいは何らかの物質の濃度変化が関与するのではないかと述べている。また Oakley ら⁵³⁾ によればカエル RPE・脈絡膜標本の脈絡膜側浸漬液 [K⁺] 増加によって RPE 細胞内 [K⁺] が増加し、apical 膜の Na⁺-K⁺ pump current が低下して、すなわち apical 膜の電氣的性質が変化して apical 膜は basal 膜に比しより大きく脱分極するという。Kawasaki ら³⁴⁾ および Oakley ら⁵³⁾ の報告では RPE 層の一方の側の細胞外液組成変化による RPE 細胞内物質 (イオンなど) の組成変化が生じ反対側の膜の電氣的性質が変化して膜電位は変化したと推測されている。脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加によって生じると考えられる RPE 細胞内物質組成変化の 1 つとして Dawis ら⁴⁰⁾ は RPE 細胞内 [HCO₃⁻] 増加を予想している。Dawis ら⁵⁰⁾ によれば脈絡膜側 [HCO₃⁻] が増加すると nonionic permeation⁵⁰⁾ によって RPE 細胞内 [HCO₃⁻] が増加し、その結果 apical 膜の電氣的性質が変化し apical 膜が脱分極するという。これに類似の現象が脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加にともなうと仮定することが許されるとすれば、本編で観察された脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加による apical および basal 膜の脱分極 (図 14) は、脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加によって生じた RPE 細胞内物質 (HCO₃⁻ など) 組成変化が apical 膜の電氣的性質を変化させて発現したのかもしれない。しかし RPE 層の脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加によって RPE 細胞の主に apical 膜の電氣的性質が変化して apical 膜が脱分極する真の機序は現在のところ不明である。

本編では 1.4% NaHCO₃ 水溶液静注によって温血動物 (ネコ、シロカイウサギ) の眼球常存電位が減少すること (図 6, 7)、この現象 (1.4% NaHCO₃ 応答) が主に RPE 層に由来し、RPE 層の主に脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加に応じる TEP 減少を反映すること (ネコ、図 8A, 9A) および RPE 細胞内記録の成績から RPE 層の脈絡膜側 [HCO₃⁻] 増加によって RPE 細胞の apical 膜の電氣的性質が変化して apical 膜が脱分極

し TEP が減少すること (ネコ, 図 13) が示された。1.4% NaHCO_3 応答は RPE 層の活動を反映していると考えられる。1.4% または 7% NaHCO_3 水溶液静注によって正常人眼眼球常存電位は減少するが⁵⁶⁾, 網膜色素変性症 (本症は視細胞と RPE の変性を主病変とすることが通説となっている⁵⁷⁾) では 1.4% または 7% NaHCO_3 水溶液を静注しても眼球常存電位は変化しない (第 2 編⁵⁸⁾ で詳述する) という事実は 1.4% NaHCO_3 応答が RPE 層の活動を反映すると本編の結論と背馳しない。以上要するに本編は 1.4% NaHCO_3 応答を RPE 層の機能検査として臨床応用するに先立ちその主な発生部位を明らかにしたものである。

結 論

眼球の角膜側と強膜側との間に存在する電位差 (眼球常存電位, V_w) および硝子体と強膜側との間に存在する電位差 (V_p) に対して血漿に等張の 1.4% NaHCO_3 水溶液静注がおよぼす影響をネコおよびシロカイウサギ (in vivo) で観察した。さらにその発生機序を明らかにすることを目的としてネコ in vitro 標本を用いて検討を加え, 下記の結果を得た。

1. 眼球常存電位 (V_w) および V_p は 1.4% NaHCO_3 水溶液静注によって減少した (in vivo)。

2. 網膜色素上皮 (RPE)・脈絡膜 in vitro 標本をはさんで導出される trans-epithelial potential (TEP) は脈絡膜側に対して視細胞側陽性の極性を呈し, この極性は眼球常存電位 (V_w) および V_p の極性と一致していた。

3. TEP (in vitro) は脈絡膜側浸漬液の HCO_3^- 濃度 ($[\text{HCO}_3^-]$) 上昇によって減少した。この TEP 減少は 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位 (V_w) および V_p の減少と極性において一致していた。

4. TEP (in vitro) は視細胞側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇によって増大した。

5. TEP (in vitro) は脈絡膜側浸漬液の pH 上昇および視細胞側浸漬液の pH 上昇いずれによっても変化しなかった。

6. 眼球前部標本 (角膜, 虹彩, 毛様体および水晶体からなる) の角膜側と硝子体側の間の電位差 (in vitro) は硝子体側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ を上昇させても変化しなかった。

7. 遊離網膜の硝子体側と視細胞側の間の電位差 (in vitro) は硝子体側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇および視細胞側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇いずれによっても減少しなかった。

8. 脈絡膜側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ を上昇させると RPE 細胞の apical 膜は basal 膜に比しより脱分極

し, TEP は膜電位の脱分極性変化に対応して減少した。視細胞側浸漬液の $[\text{HCO}_3^-]$ を上昇させると RPE 細胞の apical 膜は basal 膜に比べより過分極し, TEP は膜電位の過分極性変化に対応して増大した (in vitro)。

以上の成績から, 1.4% NaHCO_3 応答 (血漿に等張の 1.4% NaHCO_3 水溶液静注による眼球常存電位の減少) は RPE に密接に関連し, 主として RPE の脈絡膜側における $[\text{HCO}_3^-]$ 上昇によって誘起される RPE の apical 膜の脱分極に由来する TEP の減少を反映することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師米村大蔵教授に深甚の謝意を捧げます。終始, 御指導, 御教示を賜りました河崎一夫助教授に深謝いたします。本研究に多大な御協力を頂きました向茂雄博士に感謝いたします。実験器具製作に御協力下さった水野清澄技官に感謝します。

文 献

- 1) Granit, R.: The resting potential. Some further properties of the component potentials of the electroretinogram. In R. Granit (ed.), *Sensory Mechanisms of the Retina*, p 69-88, Hafner Publishing Company, New York, 1963.
- 2) Fishbarg, J.: Potential difference and fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Biochem. Biophys. Acta*, **288**, 362-366 (1972).
- 3) Brindley, G. S.: The resting potential of the lens. *Brit. J. Ophthalmol.*, **40**, 385-391 (1956).
- 4) Lehmann, G. & Meesmann, A.: Über das Bestehen eines Donnangleichgewichtes zwischen Blut und Kammerwasser bzw. Liquor cerebrospinalis. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **205**, 210-232 (1924).
- 5) Noell, W. K.: Studies on the electrophysiology and the metabolism of the retina. U.S.A. F. School of Aviation Medicine, Project No.21-1201-0004, Report No.1, 1953.
- 6) Miller, S. S. & Steinberg, R. H.: Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J. Memb. Biol.*, **36**, 337-372 (1977).
- 7) Steinberg, R. H. & Miller, S. S.: Aspects of electrolyte transport in frog pigment epithelium. *Exp. Eye Res.*, **16**, 365-372 (1973).
- 8) Brown, K. T.: An early potential evoked by light from the pigment epithelium-choroid complex

- of the eye of the toad. *Nature*, **207**, 1249-1253 (1965).
- 9) Steinberg, R. H., Schmidt, R. & Brown, K. T.: Intracellular responses to light from cat pigment epithelium: Origin of the electroretinogram c-wave. *Nature*, **227**, 728-780 (1970).
- 10) Griff, E. R., Shirao, Y. & Steinberg, R. H.: Ba²⁺ unmasks K⁺ modulation of the Na⁺-K⁺ pump in the frog RPE. *J. Gen. Physiol.*, **86**, 853-876 (1985).
- 11) Faber, D. S.: Analysis of the slow transretinal potentials in response to light. Ph. D. dissertation, State University of New York at Buffalo, 1969.
- 12) Griff, E. R. & Steinberg, R. H.: Origin of the light peak: In vitro study of Gekko gekko. *J. Physiol.*, **331**, 637-652 (1982).
- 13) Linsenmeier, R. A. & Steinberg, R. H.: Origin and sensitivity of the light peak in the intact cat eye. *J. Physiol.*, **331**, 653-673 (1982).
- 14) Arden, G. B. & Kelsey, J. H.: Changes produced by light in the standing potential of the human eye. *J. Physiol.*, **161**, 189-204 (1962).
- 15) Arden, G. B., Barrada, A. & Kelsey, J. H.: New clinical test of retinal function based upon the standing potential of the eye. *Br. J. Ophthalmol.*, **46**, 449-467 (1962).
- 16) Gouras, P. & Carr, R. E.: Light-induced DC responses of monkey retina before and after central retinal artery interruption. *Invest. Ophthalmol.*, **4**, 310-317 (1965).
- 17) 真舘幸子: サル light rise におよぼす sodium aspartate および monoiodoacetic acid の影響. *日眼会誌*, **84**, 607-616 (1980).
- 18) Yonemura, D. & Kawasaki, K.: New approaches to ophthalmic electrodiagnosis by retinal oscillatory potential, drug-induced responses from retinal pigment epithelium and cone potential. *Doc. Ophthalmol.*, **48**, 163-222 (1979).
- 19) 河崎一夫, 山本幸子, 米村大蔵: 網膜外層の新機能検査法. *日眼会誌*, **81**, 1303-1312 (1977).
- 20) 河崎一夫, 柳田 隆, 山本幸子, 米村大蔵: 人眼網膜色素上皮活動におよぼす高張液静脈内注入の影響. *臨眼*, **31**, 889-894 (1977).
- 21) 河崎一夫, 米村大蔵, 田辺譲二, 山本幸子, 川口博治, 仲里博彦: 網膜色素上皮の薬物誘発応答とその臨床応用. *眼紀*, **30**, 116-124 (1979).
- 22) 真舘幸子: 眼球常存電位におよぼす高浸透圧負荷の効果とその臨床応用. (I) ヒト, サルおよびイヌにおける分析. *日眼会誌*, **86**, 374-384 (1982).
- 23) 真舘幸子: 眼球常存電位におよぼす高浸透圧負荷の効果とその臨床応用. (II) 正常者における検討. *日眼会誌*, **86**, 385-395 (1982).
- 24) 真舘幸子: 眼球常存電位におよぼす高浸透圧負荷の効果とその臨床応用. (III) 数種の網脈絡膜疾患における検討. *日眼会誌*, **86**, 396-413 (1982).
- 25) 米村大蔵: 電気生理学的手法による網膜層別機能検査とくに網膜色素上皮の薬物誘発応答. *眼紀*, **36**, 672-681 (1985).
- 26) 米村大蔵, 河崎一夫, 田辺譲二, 山本幸子: Diamox による眼球電気現象の変化とその臨床応用. *眼紀*, **29**, 408-416 (1978).
- 27) 真舘幸子, 米村大蔵, 河崎一夫: 網膜色素上皮の acetazolamide 誘発応答 (Diamox 応答). 正常範囲の推定. *日眼会誌*, **88**, 1267-1272 (1984).
- 28) 米村大蔵, 向 茂雄, 藤井 茂, 瀬川安則: ネコとウサギの高浸透圧応答について. *眼臨*, **80**, 130 (1986).
- 29) 米村大蔵: 人眼網膜電図の研究. *日眼会誌*, **81**, 1632-1665 (1977).
- 30) 向 茂雄, 河崎一夫, 米村大蔵: 網膜色素上皮の薬物誘発電位: 高浸透圧応答について. *日眼会誌*, **86**, 970-975 (1982).
- 31) Kawasaki, K., Yonemura, D., Mukoh, S. & Tanabe, J.: Hyperosmolarity-induced changes in the transepithelial potential of the human and frog retinae. *Doc. Ophthalmol. Proc. Ser.*, **37**, 29-33 (1982).
- 32) 向 茂雄: 高浸透圧負荷に対する網膜色素上皮の電氣的反応. *日眼会誌*, **89**, 482-497 (1985).
- 33) 向 茂雄, 米村大蔵, 河崎一夫: 高浸透圧応答: 網膜色素上皮の膜電位からの検討. *日眼会誌*, **88**, 1492-1496 (1984).
- 34) Mukoh, S., Kawasaki, K., Yonemura, D. & Tanabe, J.: Hyperosmolarity-induced hyperpolarization of the membrane potential of the retinal pigment epithelium. *Doc. Ophthalmol.*, **60**, 369-374 (1985).
- 35) Kawasaki, K., Mukoh, S., Yonemura, D., Fujii, S. & Segawa, Y.: Acetazolamide-induced changes of the membrane potentials of the retinal pigment epithelial cells. *Doc. Ophthalmol.*, **63**, 375-381 (1986).
- 36) 打田昭子, 所 敬, 林 一彦, 福下公子: 高張液負荷による強度近視の EOG. *眼紀*, **30**, 1794-1798 (1979).

- 37) Madachi-Yamamoto, S., Yonemura, D. & Kawasaki, K.: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity. Normative data. *Doc. Ophthalmol.*, **57**, 153-162 (1984).
- 38) Yonemura, D., Kawasaki, K. & Madachi-Yamamoto, S.: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity. Choroidal dystrophies. *Doc. Ophthalmol.*, **57**, 163-173 (1984).
- 39) Kawasaki, K., Madachi-Yamamoto, S. & Yonemura, D.: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity. Rhegmatogenous retinal detachment. *Doc. Ophthalmol.*, **57**, 175-180 (1984).
- 40) Kawasaki, K., Madachi-Yamamoto, S. & Yonemura, D.: Hyperosmolarity response of ocular standing potential as a clinical test for retinal pigment epithelium activity. Diabetic retinopathy. *Doc. Ophthalmol.*, **58**, 375-384 (1984).
- 41) 若林謙二, 米村大蔵, 河崎一夫: 網膜疾患の電気生理学的分析. Stargardt 病-黄色斑眼底群. 臨眼, **39**, 299-303 (1985).
- 42) 米村大蔵, 河崎一夫, 石田ひとみ, 山崎清彦, 柳田 隆, 向 茂雄, 瀬川安則: 白内障手術後の網膜色素上皮機能失調. 日眼会誌, **86**, 649-653 (1985).
- 43) Kawasaki, K., Yonemura, D., Yanagida, T., Segawa, Y., Wakabayashi, K., Mukoh, S., Ishida, H., Fujii, S. & Takahara, Y.: Suppression of the hyperosmolarity response after cataract surgery. *Doc. Ophthalmol.*, **63**, 367-373 (1986).
- 44) 若林謙二: 原発性黄斑部変性症の電気生理学的特徴についての研究. 十全医会誌, **95**, 399-439 (1986).
- 45) Winkler, B. S.: The electroretinogram of the isolated rat retina. *Vision Res.*, **12**, 1183-1198 (1972).
- 46) Tsacopoulos, M., Baker, R., Hamasaki, D. & David, N. J.: Studies on retinal blood flow regulation: the effect of PaCO_2 on blood flow, oxygen availability, oxygen consumption rate and ERG in monkeys. *Exp. Eye Res.*, **17**, 391 (1973).
- 47) Niemeyer, G., Nagahara, K. & Demant, E.: Effects of changes in arterial Po_2 and Pco_2 on the electroretinogram in the cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **23**, 678-683 (1982).
- 48) Linsenmeier, R. A., Mines, A. H. & Steinberg, R. H.: Effects of hypoxia and hypercapnia on the light peak and electroretinogram of the cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **24**, 37-46 (1983).
- 49) Niemeyer, G. & Steinberg, R. H.: Differential effects of pCO_2 and pH on the ERG and light peak of the perfused cat eye. *Vision Res.*, **24**, 275-280 (1984).
- 50) Dawis, S., Hofmann, H. & Niemeyer, G.: The electroretinogram, standing potential, and light peak of the perfused cat eye during acid-base changes. *Vision Res.*, **25**, 1163-1177 (1985).
- 51) Niemeyer, G.: Acid-base balance affects electroretinogram b- and c-wave differentially in the perfused cat eye. *Doc. Ophthalmol.*, **63**, 113-120 (1986).
- 52) Steinberg, R. H., Linsenmeier, R. A. & Griff, E. R.: Retinal pigment epithelial cell contributions to the electroretinogram and electro-oculogram. In N. N. Osborne & G. J. Chader (eds.), *Progress In Retinal Research*, Vol.4, p33-66, Pergamon Press, Oxford, 1985.
- 53) Steinberg, R. H. & Miller, S. S.: Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium. In K. M. Zinn & M. F. Marmor (eds.), *The Retinal Pigment Epithelium*, p205-225, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 54) Singer, R. B., Deering, R. C. & Clark, J. K.: The acute effects in man of a rapid intravenous infusion of hypertonic sodium bicarbonate solution. II. Changes in respiration and output of carbon dioxide. *J. Clin. Invest.*, **35**, 245-253 (1956).
- 55) Oakley, B., II, Miller, S. S. & Steinberg, R. H.: Effect of intracellular potassium upon the electrogenic pump of frog retinal pigment epithelium. *J. Memb. Biol.*, **44**, 281-307 (1978).
- 56) Roos, A. & Boron, W. F.: Intracellular pH. *Physiol. Rev.*, **61**, 296-434 (1981).
- 57) Green, W. R.: Primary pigmentary degeneration of the retina. In W. H. Spencer (ed.), *Ophthalmic Pathology; An Atlas and Textbook*, p1210-1219, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1985.
- 58) 瀬川安則: 炭酸水素ナトリウムに対する網膜色素上皮の電氣的反応とその臨床応用. II. 正常眼および病眼における検討. 十全医会誌, **96**, 1022-1041 (1987).

Electrical Response of the Retinal Pigment Epithelium to Sodium Bicarbonate (I)
Experimental Studies in Animals Yasunori Segawa, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **96**, 1008—1021 (1987)

Key words: retinal pigment epithelium, bicarbonate, electro-oculogram (EOG), electro-retinogram (ERG), membrane potential

Abstract

The present study was performed to examine the effect of an intravenous injection of NaHCO₃ on the ocular standing potential and to elucidate the mechanisms involved in the generation of the effect. In the dark, the in vivo ocular standing potential of cats and rabbits was decreased by an intravenous injection of isotonic 1.4% NaHCO₃ solution. In vitro, the electrical potential across cat retinal pigment epithelium (RPE)-choroid preparation (trans-epithelial potential, TEP) decreased by raising the HCO₃⁻ concentration ([HCO₃⁻]) in the basal solution (the solution facing the choroid) and increased by raising [HCO₃⁻] in the apical solution (the solution facing the apical surface of the RPE). In addition, the electrical potential across the anterior segment (consisting of the cornea, the iris, the ciliary body and the lens) of the excised cat eye was not affected by raising [HCO₃⁻] in the vitreous side. The electrical potential across isolated retina increased transiently by raising [HCO₃⁻] in the vitreous side and was not affected by raising [HCO₃⁻] in the receptor side. The in vitro decrease of TEP resulting from the elevation of basal [HCO₃⁻] coincided with an in vivo decrease in the standing potential resulting from an intravenous injection of 1.4% NaHCO₃ solution. Therefore the decrease of the standing potential induced by an intravenous injection of 1.4% NaHCO₃ solution occurred chiefly as a result of elevating the [HCO₃⁻] on the basal side of the RPE. Hereafter the 1.4% NaHCO₃ response is defined as a decrease in the standing potential induced by an intravenous injection of 1.4% NaHCO₃. Intracellular recordings from the RPE were made in cat RPE-choroid preparation to investigate whether the decrease in TEP resulting from elevating the basal [HCO₃⁻] occurred at either the apical or basal membrane or across the paracellular shunt. Elevating basal [HCO₃⁻] depolarized the apical membrane more than the basal membrane, and led to a decrease in TEP. These findings suggest that the decrease in TEP induced by elevating basal [HCO₃⁻] was primarily due to changes in the membrane potentials of the RPE cells and not to changes in the paracellular shunt. It was concluded that the 1.4% NaHCO₃ response is initiated as a result of the increase in the [HCO₃⁻] on the basal side of the RPE and that it is mainly generated by a depolarization of the apical membrane of the RPE cells.